

CLAUDIVÂNIA MIRANDA DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZÓIDES DE
Prorops nasuta (HYMENOPTERA : BETHYLIDAE)**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48e
2007

Oliveira, Claudivânia Miranda de, 1975-
Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides de
Prorops nasuta (Hymenoptera : Bethyidae) / Claudivânia
Miranda de Oliveira. – Viçosa, MG , 2007.
xiii, 34f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Lino Neto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-34.

1. Ultra-estrutura (Biologia). 2. Sêmen - Anatomia.
3. Himenóptero - Morfologia. 4. Himenóptero -
Classificação.
5. Himenóptero - Reprodução. 6. Vespa - Biologia.
7. *Prorops nasuta*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 571.633

CLAUDIVÂNIA MIRANDA DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZÓIDES DE
Prorops nasuta (HYMENOPTERA : BETHYLIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de fevereiro de 2007

**Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-Orientador)**

**Profa. Karina Carvalho Mancini
(Co-Orientadora)**

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Profa. Uyrá dos Santos Zama

**Prof. José Lino Neto
(Orientador)**

As certezas que temos

De tudo ficaram três coisas

A certeza de que estamos sempre começando,
A certeza de que é preciso continuar,
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos fazer da
Interrupção, um caminho novo,
Da queda, um passo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro.

Fernando Pessoa

Ao meu Senhor Jesus Cristo que foi um exemplo de vida, que nos deixou mensagens de amor, perdão e fraternidade, e que deu a vida por nós.

E aos meus grandes amores.

Aqueles que são minha fonte de luz, minha inspiração, minha força insistente de não desistir e continuar.

Aqueles que mais me incentivam, apóiam, acreditam no meu sucesso e lutam por mim,

Aqueles que me deram à vida e que diretamente contribuíram por tudo que sou.

Meus pais:

João Paulo de Oliveira (in memoriam) e

Divaci Miranda Alves de Oliveira

E meus irmãos:

Ana Cléia Miranda de Oliveira

Ana Ruth Miranda de Oliveira

James Paulo Miranda de Oliveira

Ana Paula Miranda de Oliveira

João Paulo de Oliveira júnior

Neste momento expresso meu eterno amor.

Pai gostaria de ter me despedido e ter dito adeus.

Você que foi um exemplo de força, honestidade, sabedoria, perseverança, simplicidade.

Um pai carinhoso, cuidadoso e amigo.

Agradeço tudo que me ensinou e os momentos felizes que me proporcionou.

Meu peito ainda sente a dor da perda.

Tenho vontade de novamente te sentir, tocar, abraçar, ouvir...

Que saudade meu amor...

Como chora meu coração...

“Guerreiros são pessoas
São fortes são frágeis
Guerreiros são meninos
No fundo do Peito
Precisam de um descanso
Precisam de um remanso
Precisam de um sonho
Que os tornem refeitos”
(Gonzaguinha)

AGRADECIMENTOS

A expressão da gratidão é uma das mais importantes demonstrações de amor. Quando mostramos gratidão, retribuímos em pequenas porções o grande bem que nos é dirigido pelas mãos bondosas daqueles que dedicam suas vidas a servir. Quero expressar minha gratidão a Deus, Pai eterno e Criador de todas as coisas, pelo Teu incondicional amor, pela força e conforto nos momentos difíceis, pela oportunidade de formação, pelo conhecimento adquirido a cada dia, por iluminar meus caminhos, por jamais me abandonar e, enfim, por permitir que tudo isso fosse possível.

Minha eterna gratidão aos meus amados e maravilhosos pais João Paulo de Oliveira (*in memoriam*) e Divaci Miranda Alves de Oliveira que doaram o melhor de suas vidas em prol do meu conhecimento e desenvolvimento. Obrigada pelo exemplo de força, honestidade, perseverança e sabedoria.

Ao meus queridos irmãos Kéia, Rutinha, James, Paulinha e Júnior pelo carinho, amor e apoio. Obrigada pelos momentos de alegria, cumplicidade e amizade, por sempre me incluírem em suas orações e simplesmente por serem meus irmãos.

Ao meu querido orientador e amigo José Lino Neto. Minha gratidão pelo aceite da missão de me orientar, pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão diante das minhas limitações, pelo exemplo de competência e amizade. Lino, obrigada por tudo.

Meus sinceros agradecimentos à Co-orientadora Dra. Karina Mancini, que com imensa dedicação, competência, compreensão e amizade, compartilhou seus conhecimentos. Karina jamais esquecerei tudo que fez por mim.

Ao Co-orientador Professor Clóvis Andrade Neves. Obrigada pelo exemplo de simplicidade, profissionalismo e amizade.

Ao Professor Sérgio Luiz Pinto da Matta pelo carinho, amizade, gentileza, atenção e bom humor, o qual será sempre lembrado pela inigualável e irreverente forma de ensinar.

À Dra. Uyrá dos Santos Zama pelas sugestões e amizade.

Ao professor Lúcio Antônio de Oliveira Campos. Obrigada pelos conhecimentos, profissionalismo e gentil esforço de sempre querer ajudar.

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural: Sílvia, Mara, Serrão, João Marcos, Everaldo, Izabel, Adilson, Tânia.

As minhas amigas Rejane, Reggiani, Ignez, Dinha, Sirlene, Patrícia e Cirlei. Obrigada pela tão agradável convivência, pela força e apoio nos momentos mais difíceis, pelas alegrias compartilhadas, pela amizade e cumplicidade que construímos. Em especial a Rejane pelo companheirismo em todos esses anos de vida acadêmica.

Aos meus amigos-irmãos Max e Edson pela cumplicidade, amizade e grande ajuda em todos os momentos, apesar da escassez de palavras... Muito obrigada!

Aos demais amigos do curso de Biologia Celular e Estrutural Edmilson, Mariáurea, Michele, Gisele, Gláucia, Jaqueline, Luiz, Fabiano, Marcos, Diego, Fabiana, Frederico, Marcília, Mônica, Lamara, Edalton, Dani, Ana Paula e aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural Lílían, Jane, Vinícius, Poliana, Alex, Tetsu, pela ótima convivência e contribuição na construção desse trabalho.

Aos amigos Emerson e Dinha e ao funcionário do Apiário da UFV Íris por terem me ajudado na coleta do café e principalmente pela grande amizade construída.

Às Funcionárias do Departamento de Biologia Geral Rose, Diana, Salvadora e Beth.

À Dra. Mary Anne Heidi Dolder por ter me recebido tão bem em seu laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (IB-UNICAMP).

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo patrocínio financeiro.

Ao Governo do Estado de Alagoas, em especial a Secretaria de Educação pelo incentivo financeiro e concessão do afastamento para Pós-Graduação.

Ao Governo do Município de Arapiraca pelo incentivo financeiro em especial ao Secretário da educação Prof. Cézar Fontes pelo apoio e concessão do meu afastamento para Pós-Graduação.

Aos grandes amigos Rosa e Carlos pelo apoio e grande ajuda na concessão do meu afastamento.

As escolas Estadual Senador Rui Palmeira e Municipal Manoel Humberto da Costa.

Àqueles que de alguma forma e em algum momento contribuíram para que eu chegasse até aqui, minha querida prima Suely, meu tio José Guilherme, as amigas Jaci e Juciane, a Profa Lurdes, ao grande amigo Félix, ao Prof. Pirrita e ao Prof. Alves da academia Corpo e Performance.

A minha prima Ana e ao Alexandre (nego preto), não poderia esquecer de vocês.

Ao Rodolfo por ter contribuído de forma diferente e especial, pelo carinho e bons momentos.

Aos amigos antigos, recentes de vários lugares desse mundo.

Enfim, obrigada a todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

“O coração do homem planeja
o seu caminho, mas o Senhor
lhe dirige os passos
provérbios 16:9”

BIOGRAFIA

Claudivânia Miranda de Oliveira, filha de João Paulo de Oliveira e Divaci Miranda Alves, nasceu em Traipú, Alagoas, Brasil, em 1 de abril de 1975. Em março de 1998, licenciou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL), Arapiraca – AL, Brasil.

Em Fevereiro de 1998, iniciou atividade de docência, como professora efetiva do Ensino Fundamental, pela Prefeitura de Arapiraca-AL, Brasil.

Em 2001, passou a fazer parte do quadro de professores efetivos do Ensino Médio da Secretaria de Educação do Estado de Alagoas, Brasil.

Em outubro de 2001 iniciou o curso de especialização em Biologia “Latu-Sensu”, na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Brasil, concluindo em julho de 2003.

Em 2005, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, Brasil, defendendo tese em fevereiro de 2007. Neste mesmo mês foi aprovada no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

1.	RESUMO	x
2.	ABSTRACT	xii
3.	Introdução	1
3.1	A Ordem Hymenoptera	1
3.2	A família Bethylidae	2
3.3	Morfologia Geral dos Espermatozóides nos Hymenoptera	4
4.	Objetivos	6
5.	Capítulo: Estrutura e Ultra-estrutura dos Espermatozóides de <i>Prorops nasuta</i> Waterston, 1923 (Hymenoptera – Bethylidae).	7
5.1	Introdução	9
5.2	Material e Métodos	11
5.3	Resultados	13
5.4	Discussão	18
5.5	Referências Bibliográficas	23
6	Conclusões	28
7	Referências Bibliográficas	29

RESUMO

OLIVEIRA, Claudivânia Miranda , M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides de *Prorops nasuta* (Hymenoptera : Bethylidae)**. Orientador: José Lino Neto. Co-Orientadores: Clóvis Andrade Neves e Karina Carvalho Mancini.

Nas relações evolutivas entre os Hymenoptera ainda há muitas dúvidas devido à sua considerável diversidade, ao grande número de espécies e também ao pequeno tamanho da maioria dos himenópteros parasitóides, o que dificulta sua classificação. As investigações ultra-estruturais dos espermatozóides têm fornecido valiosas contribuições para o estudo filogenético de muitos grupos de animais, incluindo os insetos. Isso porque, os caracteres dessas células apresentam uma natureza mais conservativa do que aqueles morfológicos tradicionalmente usados. Assim, neste trabalho propusemos caracterizar a morfologia dos espermatozóides de *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethylidae), utilizando as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozóides em *Prorops nasuta* medem 665 µm de comprimento e são lineares e muito finos. Eles são constituídos de uma região de cabeça, consistindo de acrossomo e núcleo com 17,5 µm de comprimento, e uma região de flagelo, que inclui o axonema com arranjo microtubular 9+9+2, adjunto do centríolo, dois corpos acessórios e dois derivados mitocondriais. O flagelo possui diâmetro constante até aproximadamente a sua metade, tornando-se afilado e terminando, excepcionalmente, com uma longa porção bastante delgada. No núcleo, de cromatina compacta e elétron densa, ocorrem, posteriormente, várias áreas claras, como observado em algumas espécies de abelhas. O adjunto do centríolo corre em paralelo ao axonema e a um dos derivados mitocondriais, como ocorre na maioria dos Aculeata. Os derivados mitocondriais são simétricos em forma e diâmetro, diferindo da maioria dos Aculeata, exceto formigas. Também semelhante às formigas é a presença de material paracristalino nos dois derivados mitocondriais, embora o formato e a disposição desse

material, nos derivados, diferem de todas as outras espécies já estudadas. De modo geral, os espermatozóides de *Prorops nasuta* são semelhantes àqueles da maioria dos Hymenoptera, entretanto apresentam várias características exclusivas o que confirma o potencial destas células em análises filogenéticas e taxonômicas da superfamília Chrysidoidea, bem como dos Hymenoptera em geral.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Claudivânia Miranda, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2007. **Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Prorops nasuta* (Hymenoptera : Bethylidae)**. Adviser: José Lino Neto. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves and Karina Carvalho Mancini

In the evolutionary relationships among Hymenoptera there are still a lot of doubts due to their considerable diversity, to the great number of species and also to the small size of most of the parasitoid hymenopterans, what hinders its classification. The ultrastructural investigations of the spermatozoa have been supplying valuable contributions for the phylogenetic study of many groups of animals, including the insects. Its occurs because the characters of those cells present a more preservative nature than those morphologic ones traditionally used. Like this, in this study we intended to characterize the morphology of the spermatozoa of *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethylidae), using the light and transmission electron microscopies. The spermatozoa of *Prorops nasuta* measure 665 μm in length and they are linear and very thin. They are constituted of a head area, consisted of acrosome and nucleus with 17,5 μm in length, and a flagellum area, that includes the axoneme with microtubular arrangement 9+9+2, centriolar adjunct, two accessory bodies and two mitochondrial derivative. The flagellum possesses constant diameter until approximately its medium portion, becoming thin and finishing, exceptionally, with a long quite thin region. In the nucleus, with compact and electron dense cromatin, occurs, later, several clearly areas, as observed in some species of bees. The centriolar adjunct runs parallel to the axoneme and one of the mitochondrial derivative, as observed in most of the Aculeata. The mitochondrial derivative are similar in shape and diameter, differing of most of the Aculeata, except ants. Also likely to the ants, there are paracrystalline materials in both mitochondrial derivative, although the shape and the location of that material differ of all the other species already studied. In general, the spermatozoa of *Prorops nasuta* are similar to those observed in most of the Hymenoptera, however they present some

exclusive characteristics, which confirms the potential of these cells in phylogenetic and taxonomic analyses in the Chrysoidea superfamily, as well as of the Hymenoptera in general.

1- INTRODUÇÃO

1.1 A ORDEM HYMENOPTERA

Com aproximadamente 120 mil espécies descritas (Gallo *et al.*, 2002), os Hymenoptera são uma das quatro maiores ordens de insetos e apresentam grande diversidade biológica. São insetos holometábolos e, juntamente com as ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera, predominam nas faunas de áreas terrestres em todo o mundo.

A ordem Hymenoptera é dividida nas subordens Symphyta e Apocrita (Gauld & Hanson, 1995). Os Symphyta são considerados um grupo basal, contendo pouco mais que 5% das espécies descritas. Os Apocrita constituem a grande maioria das espécies e são divididos em Aculeata e Parasitica. Os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas, e possuem 19 famílias distribuídas entre as superfamílias Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea. São considerados o grupo mais derivado dentre os Hymenoptera, por apresentarem fêmeas com ferrão originado de modificações do ovopositor (LaSalle & Gauld, 1992). A maioria das espécies é predadora, no caso das vespas, ou alimenta-se de pólen, no caso das abelhas. Adicionalmente, o parasitismo é comum nos Aculeata mais basais (Chrysidoidea). O grupo Parasítica é constituído por todos os Apocrita que não tiveram o ovopositor modificado em ferrão. Este é o maior grupo dentre os Hymenoptera, sendo classificado em 48 famílias distribuídas em 11 superfamílias. A grande maioria das espécies é parasitóide, existindo também espécies fitófagas ou predadoras (Gaston, 1991).

A ordem Hymenoptera é composta por espécies de grande importância ambiental e econômica, mais do que qualquer outro grupo de insetos. Elas podem ser encontradas em grande número em quase todos os ecossistemas terrestres e interagem com outros organismos mais do que qualquer outro grupo de insetos.

Seus indivíduos podem ser fitófagos, entomófagos ou a combinação de ambos. Entre os indivíduos fitófagos, as abelhas são os agentes mais adaptados à visita de flores das angiospermas (Kevan & Baker, 1983), constituindo o grupo mais importante de polinizadores (Hanson, 1995). Desta forma, se tornam essenciais à manutenção da estrutura e perenização das florestas e da preservação da fauna que dela

dependa. Além de seu grande potencial polinizador, as abelhas apresentam estimado valor comercial com a produção de mel, pólen, própolis e cera (Kerr, 2001).

Os insetos entomófagos podem ser predadores ou parasitas, com ampla variedade de hábitos intermediários, o que dificulta sua classificação. Os parasitóides ocorrem em algumas ordens de insetos, mas cerca de 85% deles pertencem à ordem Hymenoptera. Eles ocupam os mais diversos ambientes e são fundamentais na regulação da população de outros insetos (LaSalle & Gauld, 1992). Por isso, muitos himenópteros parasitóides são utilizados com sucesso em programas de controle biológico e integrado de pragas. Dentre eles, as famílias Ichneumonidae, Braconidae, Chalcididae, Encyrtidae, Trichogrammatidae, Scelionidae e Bethylidae apresentam espécies que são os mais importantes agentes de controle biológico, responsáveis pela maioria dos benefícios econômicos produzidos por esse controle (Gauld & Bolton, 1988; La Salle & Gauld, 1992).

Devido à sua grande importância, é fundamental a preservação dos Hymenoptera. Para isso são necessários estudos precisos das espécies, proporcionando que as mesmas possam ser identificadas e classificadas adequadamente. Nesse sentido, existem quantidades consideráveis de pesquisas usando diferentes aspectos, tais como, morfologia externa, comportamento e, atualmente, análises moleculares (Rasnitsyn, 1980; Gauld & Bolton, 1988; Dowton & Austin, 1994; Dowton *et al.*, 1997; Ronquist *et al.*, 1999). Entretanto, ainda existem muitas incertezas sobre as relações evolutivas desta ordem de insetos, devido à sua considerável diversidade, ao seu grande número de espécies no grupo e ao pequeno tamanho da maioria dos himenópteros parasitóides, o que dificulta sua classificação (Dowton & Austin, 1994; Dowton *et al.*, 1997). Além dos dados anatômicos tradicionais e moleculares, a morfologia dos espermatozóides tem chamado a atenção por sua aplicabilidade potencial nas análises filogenéticas (Baccetti *et al.*, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

1.2 A FAMÍLIA BETHYLIDAE

A família Bethylidae é provavelmente a maior família dentro da superfamília Chrysidoidea, com aproximadamente 2200 espécies descritas em todo o mundo, o que pode representar cerca de 30% do grupo. Representa um grupo monofilético e o mais

basal dentre os Aculeata (Brothers & Carpenter, 1993), sendo cosmopolita, com a maior parte de suas espécies habitando as regiões tropicais. A família é distribuída em 84 gêneros entre as subfamílias Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae e Pristocerinae, (Finnamore & Gauld, 1995).

Os betilídeos são vespas pequenas, medindo entre 1 a 20 mm de comprimento. Todas as suas espécies são ectoparasitóides primários, conhecidos por atacarem larvas e pupas de besouros brocadores de madeira, sementes e grãos armazenados, bem como uma gama de microlepidópteros-praga (Cock, 1985). Por essa razão, os betilídeos são potencialmente benéficos à agricultura e silvicultura como agentes de controle biológico. Por outro lado, como são parasitóides de besouros brocadores de madeira, podem ser encontrados em habitações. Alguns gêneros, como *Cephalonomia*, *Epyris* e *Sclerodermus*, são bastante conhecidas por causarem graves dermatites em humanos devido à freqüentes picadas (Tachikawa, 1980, 1985; Terayama, 1995). Embora este seja um grupo potencialmente importante para agricultura e silvicultura, estudos aplicados envolvendo estes insetos ainda não estão avançados pela falta de conhecimentos taxonômicos, filogenéticos e biológicos dos mesmos.

Provavelmente, os betilídeos de maior importância econômica da região neotropical são duas espécies afro-tropicais – *Cephalonomia stephanoderis* (vespa-do-Togo) e *Prorops nasuta* (vespa-da-Uganda) – que foram introduzidas no Brasil para o controle da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Este besouro foi introduzido acidentalmente da África para o novo mundo, sendo agora uma das pragas que provoca maiores prejuízos à cafeicultura (Quezada & Urbina, 1987). Inseticidas sintéticos são amplamente usados para o controle desta peste, mas tais métodos possuem alto custo e são danosos para o ambiente, além de serem efetivos por um curto período de tempo. Além disso, *H. hampei* já desenvolveu resistência para alguns inseticidas. Com isso, o uso de vespas parasíticas é visto como uma viável alternativa em programas de controle biológico. (Murphy & Moore, 1990).

A vespa *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bethylinidae), objeto de estudo do presente trabalho, é um ectoparasitóide solitário e idiobionte, nativo do oeste central da África e tem sido introduzido por vários produtores de café. No Brasil, essa vespa foi introduzida em 1929 e reintroduzida década de 90 (Reis & Souza, 1998), sendo bastante utilizada em programas de controle biológico. Essas vespas parasitam principalmente os últimos estádios de larvas e pupa de *H. hampei*, mas podem parasitar

todos os estágios e passar quase todo o seu ciclo de vida dentro do fruto do café infestado pela broca (Abraham *et al.*, 1990).

1.3 MORFOLOGIA GERAL DOS ESPERMATOZÓIDES DE HYMENOPTERA

Em Hymenoptera, como nos insetos em geral, os espermatozóides são finos, geralmente muito alongados e constituídos por uma região de cabeça e outra de flagelo. A região de cabeça é formada, anteriormente, por um acrossomo seguido pelo núcleo. O acrossomo em geral é formado por uma vesícula acrossomal e um *perforatorium*, o qual tem a base inserida em uma cavidade na extremidade do núcleo. O núcleo também é bastante longo e, geralmente, apresenta a cromatina muito elétron densa e compacta. O núcleo é conectado aos elementos do flagelo através de uma estrutura elétron densa, cilíndrica e compacta, denominada adjunto do centríolo. O flagelo, por sua vez, é formado pelo axonema e geralmente dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. O axonema apresenta padrão de organização microtubular $9 + 9 + 2$, sendo nove micro- túbulos acessórios simples, nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais simples. Os derivados mitocondriais são estruturas alongadas, paralelas ao axonema, que geralmente contém inclusões paracristalinas, podendo ou não ser iguais em diâmetro e comprimento. Os corpos acessórios também são estruturas longas, situadas entre os derivados mitocondriais e o axonema e, geralmente, possuem formato aproximadamente triangular, em corte transversal.

A morfologia geral dos espermatozóides, nos diferentes grupos que compõem a ordem Hymenoptera, é diversificada e, portanto, fornece uma fonte de dados não tradicionais, tendo seus caracteres uma natureza mais conservativa que os caracteres morfológicos usados tradicionalmente. Com isso, análises filogenéticas usando características estruturais e ultra-estruturais dos espermatozóides vêm ganhando o interesse na Biologia Celular e Sistemática, sendo largamente utilizada em estudos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Baccetti, 1972; Dallai, 1979; Dallai & Afzelius, 1990, 1995; Carcupino *et al.*, 1995; Jamieson *et al.*, 1999). Adicionalmente, cada vez mais tem sido demonstrada que a diversidade morfológica dos espermatozóides é suficiente para compor um sistema de caracteres que, associado à outros conjuntos de caracteres, poderá ser usado para esclarecer vários pontos de controvérsias das relações evolutivas dos Hymenoptera.

Neste aspecto, dados da literatura incluem espécies de **Symphyta** (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999), do grupo **Aculeata**, representado por **Apidae** (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Holfing *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Peng *et al.*, 1992, 1993; Lino Neto, *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001, 2003, 2004, 2005a; Bão *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005), **Halictidae** (Fiorillo *et al.*, 2005a), **Anthophoridae** (Fiorillo *et al.* 2005b), **Sphecidae** (Zama *et al.*, 2005b, c, d), **Formicidae** (Thompson & Blum, 1967; Wheeler *et al.*, 1990; Lino & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007), **Vespidae** (Mancini *et al.*, 2006), do grupo **Parasítica**, representado por **Eurytomidae** (Lino-Neto *et al.*, 1999), **Ichneumonidae** (Chauvin *et al.*, 1988), **Megalyridae** (Newman & Quicke, 2000), **Scelionidae** (Lino-Neto & Dolder, 2001a), **Trichogrammatidae** (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino & Dolder, 2001b).

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos descrever a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), comparando sua morfologia com aquela descrita para os demais Hymenoptera estudados e com isso, fornecer novos caracteres para o melhor entendimento das relações filogenéticas, taxonômicas e da biologia reprodutiva desta espécie.

**3. ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DOS
ESPERMATOZÓIDES De *Prorops nasuta* WATERSTON, 1923
(HYMENOPTERA – BETHYLIDAE)**

**ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZÓIDES
DE *Prorops nasuta* WATERSTON, 1929 (HYMENOPTERA:
BETHYLIDAE)**

Claudivânia Miranda de Oliveira¹

Karina Mancini²

José Lino-Neto¹

¹Departamento de Biologia Geral, UFV, 36571-000, Viçosa MG, Brasil.

²Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Autor para correspondência:

Prof. Dr. José Lino Neto, Depto. de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570000, Viçosa, MG, Brasil

E-mail: linoneto@ufv.br

|

3.1 Introdução

Os Hymenoptera são uma das quatro maiores ordens de insetos e apresentam grande diversidade biológica. Ela divide-se nas subordens Symphyta e Apocrita (LaSalle & Gauld, 1992). Os Symphyta são considerados um grupo mais basal, contendo pouco mais que 5% das espécies descritas, e os Apocrita constituem a grande maioria das espécies e são divididos em Aculeata e Parasitica. Os Aculeata são considerados o grupo mais derivado dos Hymenoptera e compreendem as abelhas, formigas e vespas.

Entre os Aculeata, a superfamília Chrysidoidea representa um grupo monofilético, sendo considerada a mais basal dentro do grupo (Brothers & Carpenter, 1993). É constituída pelas famílias Bethylidae, Chrysididae, Dryinidae, Embolemidae, Sclerogibbidae, Scolebythidae e Aplumariidae, sendo as três primeiras bastante comuns e com grande número de espécies, e as demais raras e com pequeno número de espécies.

Bethylidae, é provavelmente a maior família de Chrysidoidea e, embora existam cerca de 2200 espécies descritas em todo o mundo, isto pode representar não mais que 30% do tamanho verdadeiro do grupo. A família é composta por quatro subfamílias: Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae e Pristocerinae (Finnamore & Gauld, 1995). A família Bethylidae, objeto de estudo do presente trabalho, é cosmopolita, mas a maior parte das espécies ocorre nas regiões tropicais. Todas elas são ectoparasitóides primários e conhecidas por atacarem larvas e pupas de besouros de caules, sementes e grãos armazenados, bem como uma gama de microlepidópteros-praga e coleópteros (Cock, 1985).

A vespa *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethylidae) vulgarmente denominada vespa-da-Uganda, é um ectoparasitóide solitário e idiobionte da broca do café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), que é a mais prejudicial praga do café no mundo. *Prorops nasuta* é nativa do Oeste central da África e foi introduzida no Brasil em 1929 e reintroduzida na década de 90, para ser utilizada em programas de controle biológico (Reis & Souza, 1998). Essas vespas parasitam os últimos estádios larval e pupal de *Hypothenemus hampei*, sendo também predadoras de todos os estágios biológicos da broca passando quase todo seu ciclo de vida dentro do fruto do café infestado pela praga. (Abraham *et al.*, 1990).

Embora *Prorops nasuta* já seja usada em programas de controle biológico (Infante *et al.*, 2003), ainda não há qualquer registro sobre a morfologia dos espermatozóides dessa espécie.

tem sido demonstrado que a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides em Hymenoptera, assim como em outros insetos (Baccetti, 1987; Jamieson *et al.*, 1999) fornecem variações suficientes que certamente contribuem para o maior entendimento das relações filogenéticas, taxonomia e da biologia reprodutiva da espécie ou do grupo.

Neste sentido, poucos estudos têm sido feitos envolvendo a estrutura e a ultra-estrutura dos espermatozóides de vespas parasíticas. Até o momento, os estudos mais detalhados foram realizados em vespas parasíticas pertencentes ao grupo Parasitica (Lino-Neto & Dolder, 2001a, 2001b; Lino-Neto *et al.*, 2000a, 1999; Newman & Quicke, 2000, 1999b, 19998; Quicke *et al.*, 1992; Chauvin *et al.*, 1988; Lingmei & Dunsu, 1987). No entanto, este trabalho representa a primeira descrição ultra-estrutural de um Chrysidoidea. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo a descrição estrutural e ultra-estrutural dos espermatozóides da vespa parasítica *Prorops nasuta*, comparando os resultados obtidos com os dados já descritos para outros himenópteros.

3.2 Material e Métodos

Machos adultos de *Prorops nasuta* foram coletados a partir de frutos secos de café obtidos de uma plantação na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os frutos foram mantidos no laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa por um determinado período, até os machos emergirem. Os machos de *Prorops nasuta* foram submetidos a uma temperatura de 4°C por 10 minutos para anestésiar, em seguida foram colocados em lâmina escavada contendo tampão cacodilato de sódio e dissecados utilizando-se microscópio estereoscópico. Os testículos foram retirados e processados para microscopias de luz e eletrônica de transmissão de acordo com o protocolo a seguir:

Microscopia de Luz

Morfometria geral

Machos adultos foram dissecados e tiveram suas vesículas seminais removidas e abertas sobre lâminas histológicas para o espalhamento dos espermatozoides. Estes foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por cerca de 15 minutos. Após lavagem em água destilada e secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio (Olympus, BX60), equipado com contraste de fase.

Morfometria nuclear

Para medição nuclear, algumas destas lâminas foram coradas com solução de DAPI (0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindol) por 15 minutos no escuro. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram montadas com sacarose 50% e examinadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio (Olympus, BX60), equipado com filtro de excitação BP360-370nm.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Morfologia geral

Machos adultos foram dissecados e tiveram suas vesículas seminais removidas e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, ácido pícrico 2,5%, sacarose 3% e CaCl_2 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por cerca de 2 horas. O material foi então pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 1-2 horas, desidratado em série crescente de álcool, infiltrado e, finalmente, incluído em resina Epoxi (Epon 812).

Citoquímica

Proteínas gerais e microtúbulos (Dallai e Afzelius, 1990)

Machos adultos foram dissecados e tiveram suas vesículas seminais removidas e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e ácido tânico 1%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, acrescido de sacarose 1,5% e CaCl_2 5 mM, por 3 dias à 4°C. Após lavagens no mesmo tampão, as vesículas foram contrastadas em solução de acetato de uranila aquoso 1% por 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente, foram desidratados em série crescente de álcool, infiltrados e incluídos em resina Epoxi (Epon 812).

Proteínas básicas (E-PTA)

Machos adultos foram dissecados e tiveram suas vesículas seminais dissecadas e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 1,5% e CaCl_2 5mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M de 2-12 horas. Após lavagem no mesmo tampão, estas foram desidratadas em série crescente de etanol e posteriormente contrastados em E-PTA (ácido fosfotúngstico) 1% em etanol absoluto, por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Finalmente, foram infiltrados e incluídos em resina Epoxi (Epon 812).

Nas três técnicas descritas, os cortes ultra-finos foram obtidos com navalhas de diamante e coletados em telas de cobre. Com exceção da técnica de E-PTA, os cortes foram ainda contrastados com soluções de acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 0,1%. Todos os materiais foram observados e fotodocumentados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss LEO 906), no Instituto de Biociências da Universidade de Campinas (IB-UNICAMP), São Paulo – Brasil.

3.3 Resultados

Os espermatozoides de *Prorops nasuta* são lineares, muito finos e bastante longos medindo, em média, 665 μm de comprimento (Fig. 1a). Eles consistem de uma região de cabeça e uma região de flagelo (Fig. 1a). Em microscopia de contraste de fase é possível distinguir a região de cabeça da região de flagelo, sendo possível notar ainda que o flagelo possui diâmetro constante até aproximadamente a sua metade, tornando-se afilado e terminando com uma longa porção bastante delgada (Fig. 1a). O núcleo é linear e longo, medindo, aproximadamente, 17,5 μm de comprimento (Fig. 1b).

O acrossomo é composto pela vesícula acrossomal e o *perforatorium*, os quais, em corte transversal, são elipsoidais (Fig. 1c). A base do *perforatorium* se encaixa em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo (Fig. 1d).

A região anterior núcleo é preenchida por cromatina bastante compacta e elétron densa e, em corte transversal, é levemente ovalado (Figs 1d,e). A região posterior é circular, em corte transversal, e a cromatina é elétron densa, entretanto apresenta muitas áreas claras na periferia (Fig. 1f). Através da técnica de E-PTA, notou-se que o núcleo é negativo com uma pequena região central positiva (Fig. 1g).

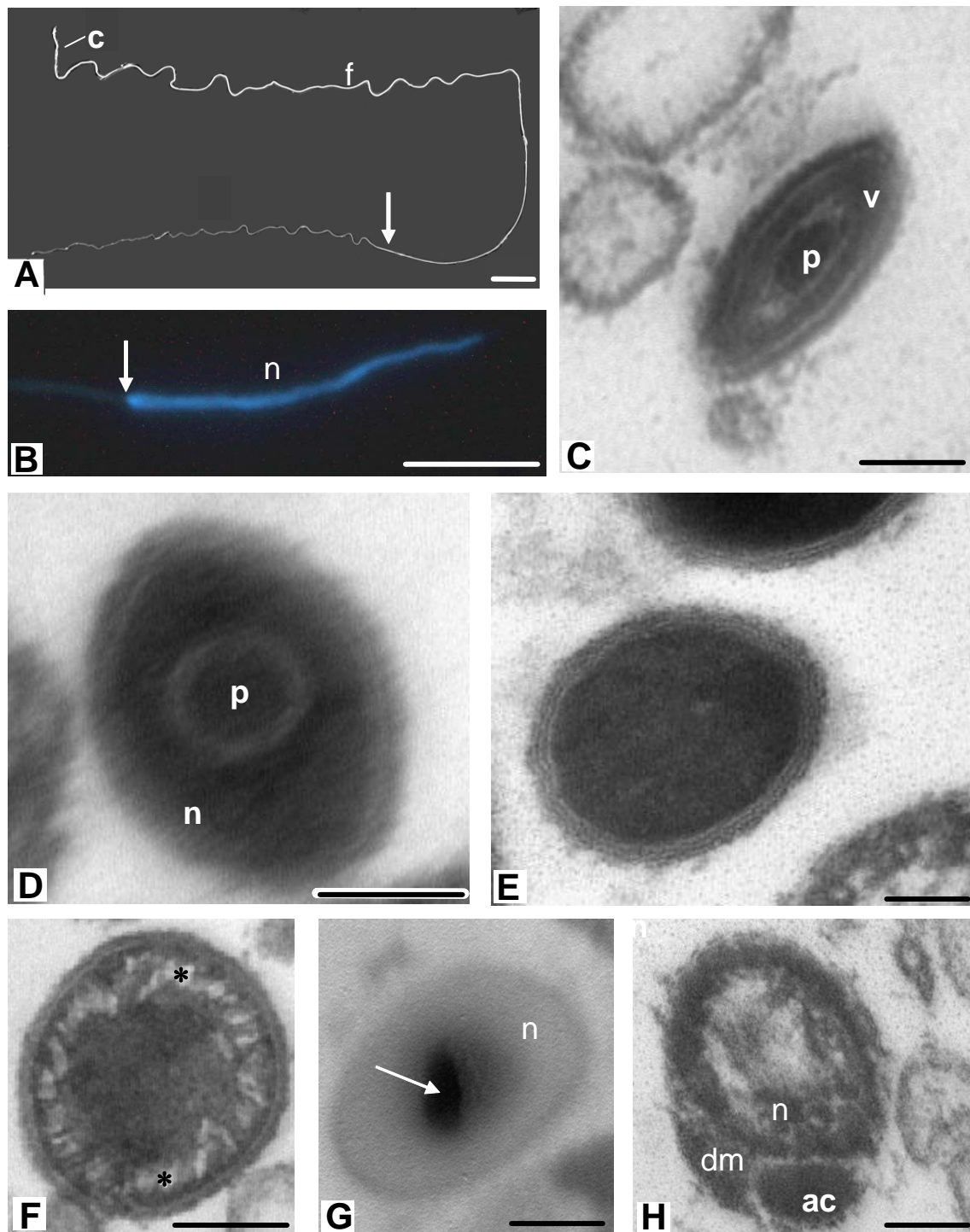
A conexão do núcleo ao flagelo se dá através do adjunto do centríolo. Este é do tipo assimétrico, se inicia ao lado da base do núcleo (Fig. 1h), se localiza paralelo ao axonema e à um dos derivados mitocondriais (Figs 2a,b). O adjunto do centríolo é elétron denso e, em corte transversal, apresenta formato ovóide, com a borda pregueada, facilmente observada pela técnica de ácido tânico (Fig. 2a). O adjunto do centríolo é E-PTA positivo em sua região periférica, porém em sua região central ele apresenta-se E-PTA negativo (Fig. 2b).

O axonema apresenta o padrão de 9+9+2 microtúbulos, sendo 9 microtúbulos acessórios simples externos, 9 duplas periféricas e dois microtúbulos centrais (Fig. 2a,c). Ele inicia-se, anteriormente, na base do núcleo e é o último a terminar no flagelo. Na região finalização, os microtúbulos centrais e as duplas terminam antes dos microtúbulos acessórios (Fig. 3a-c). Todos os microtúbulos são E-PTA positivos, entretanto o lúmen dos microtúbulos acessórios mostrou-se E-PTA negativo (Fig. 3b).

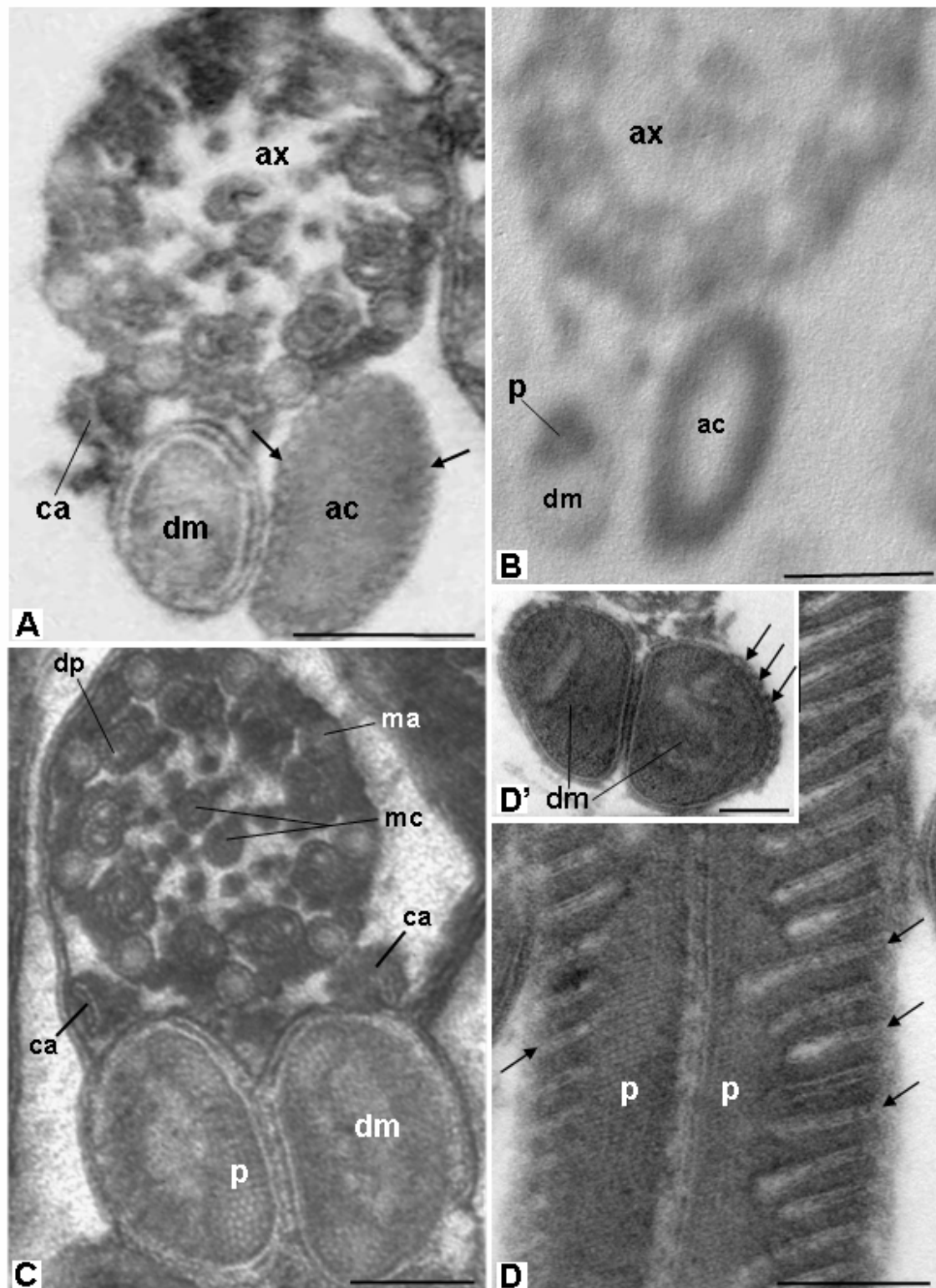
Os derivados mitocondriais, em corte transversal, são aproximadamente ovais e de diâmetros iguais (Figs 2c, 3a,b). Anteriormente, um deles começa ao lado da

base do núcleo (Fig. 1h) e o outro após o adjunto do centríolo. Posteriormente, terminam juntos, imediatamente antes do axonema perder sua organização original (Fig. 3a-c). Os derivados mitocondriais são formados basicamente por duas regiões bem distintas: a região de cristas e a de material paracristalino (Figs 2c,d). O material paracristalino está presente em ambos os derivados e, em corte transversal, tem a forma que lembra uma meia lua e ocupa as faces adjacentes ao derivado, sendo mais desenvolvida nas regiões proximais e distais ao axonema (Figs 2c,d, 3b). A região de cristas ocupa o restante do derivado (Fig. 2d) e, em corte longitudinal, apresenta-se bem desenvolvida com cristas paralelas e profundas, alcançando a região de material paracristalino (Fig. 2d). Através da técnica de E-PTA, notou-se que a região de material paracristalino é mais fortemente positiva do que a região de cristas (Fig. 3b).

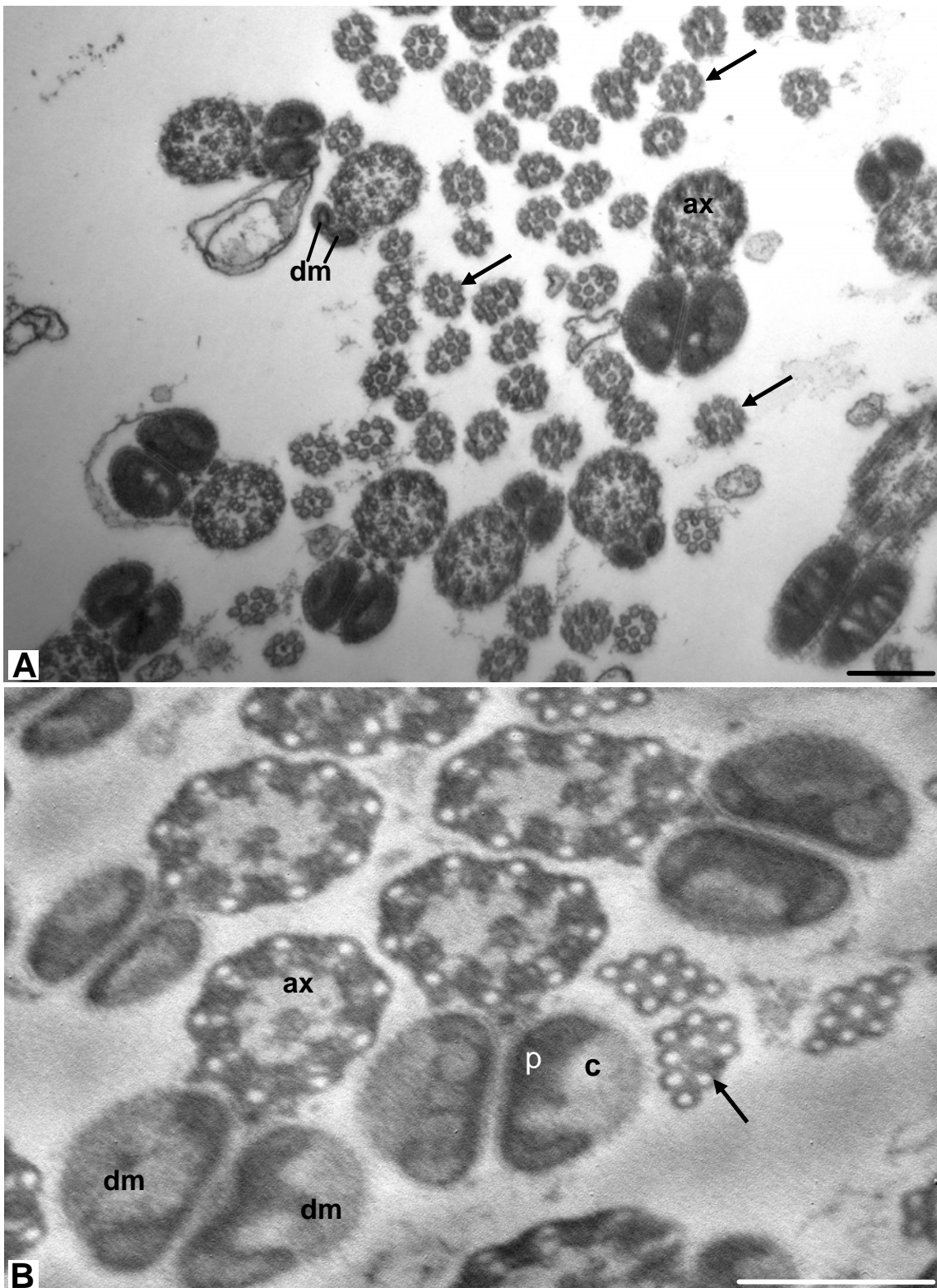
Os corpos acessórios são estruturas elétricas densas e estão localizados entre os derivados mitocondriais e o axonema (Figs 2a-c), mas não entre o axonema e o adjunto do centríolo (Figs 2a). Em corte transversal, eles se mostram pequenos e de formato irregular (Fig. 2a-c) sendo E-PTA positivos (Fig. 2b, 3b).



Figuras 1A-H: Micrografias de luz (a-b) e eletrônica de transmissão (c-h) dos espermatozoides de *P. nasuta*. **A.** Microscopia de contraste de fase, mostrando a região de cabeça (c) e a do flagelo (f). A seta indica o início da porção delgada flagelar. **B.** Núcleo corado com DAPI. A seta indica a região de transição entre núcleo (n) e flagelo. **C.** Acrossomo em corte transversal mostrando a vesícula acrossomal (v) e *perforatorium* (p). **D-F.** Cortes transversais de núcleos na região anterior (D), mediana (E) e posterior (F). Observe em D o *perforatorium* inserido em uma cavidade na extremidade do núcleo e as áreas claras (asteriscos em F) na cromatina na periferia do núcleo na região posterior. **G.** Corte transversal mostrando que apenas uma pequena região central do núcleo é E-PTA positiva (seta). **H.** Corte transversal na base do núcleo mostrando, além do núcleo, um derivado mitocondrial (dm) e o adjunto do centríolo (ac). Barras: A = 16 µm; B = 6 µm; C-E, G = 0,1 µm; F, H = 0,25 µm.



Figuras 2A-D: Micrografias eletrônica de espermatozóides de *P. nasuta* em cortes transversais (A-C, D') e longitudinal (D) do flagelo. **A.** Corte da região anterior mostrando o axonema (ax), apenas um derivado mitocondrial (dm) e um corpo acessório (ca) e o adjunto do centríolo (ac) com borda pregueada (setas). **B.** Corte também da região anterior corado com E-PTA. **C, D'.** Cortes de regiões medianas, especialmente em D', mostrando os derivados mitocondriais. **D.** Corte longitudinal dos derivados mitocondriais mostrando as cristas (setas) alcançando o material paracristalino (p). Demais legendas: dp = duplas de microtúbulos periféricas; ma = microtúbulos acessórios; dc = dupla central de microtúbulos. Barras: A, B = 0,1 μm ; C, D, D' = 0,25 μm .



Figuras 3A, B. Micrografias de espermatozóides de *P. nasuta* em cortes transversais, em diferentes níveis da região final do flagelo. **A** mostra como é comum a ocorrência de axonema em desorganização, contendo apenas os microtúbulos acessórios (setas) e **B**, os componentes do flagelo que são E-PTA positivos como, por exemplo, os microtúbulos do axonema (ax) e material paracrystalino (p) dos derivados mitocondriais (dm). Legenda: c = região das cristas mitocondriais. Barras = 0,3 μ m.

3.4 Discussão

A estrutura básica dos espermatozóides de *Prorops nasuta* é semelhante ao observado na maioria das espécies de Hymenoptera estudada. Eles apresentam um acrossomo em bicamada (vesícula acrossomal e *perforatorium*), núcleo longo com cromatina condensada, axonema com padrão microtubular 9+9+2, dois derivados mitocondriais, dois corpos acessórios e um adjunto do centríolo (Baccetti, 1972; Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998, 1999 a,b, 2000; Jamieson *et al.*, 1999; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a,b; Lino-Neto & Dolder, 2001a; 2002; Zama *et al.*, 2001, 2003, 2005a,b,c; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo, *et al.*, 2005a,b Mancini, *et al.*, 2006).

Espermatozóides lineares, como ocorrem em *Prorops nasuta*, são comuns na maioria dos Hymenoptera, mas diferem daqueles observados em Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a) e Platygastroidea (Lino-Neto & Dolder, 2001b), os quais são espiralados. A observação de que, em *P. nasuta*, o flagelo dos espermatozóides tem o diâmetro reduzido muito antes do seu término, é uma característica que diferencia esta espécie dos demais Hymenoptera estudados. O comprimento dos espermatozóides nos Hymenoptera varia de 8 µm (Quicke *et al.* 1992) a 1500 µm (Zama, *et al.* 2005a), mas a média é de aproximadamente 160 µm. Esta espécie, cujos espermatozóides medem por volta de 665 µm de comprimento, está entre aquelas que apresentam os mais longos espermatozóides, perdendo apenas para as abelhas Euglossini, *Eulema negrita* (720 µm) e *Euglossa mandibulares* (1500 µm) (Zama *et al.*, 2005a).

O acrossomo em *P. nasuta*, possuindo apenas a vesícula acrossomal revestindo o *perforatorium*, corresponde àquele observado em Symphyta (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke 1999a), Aculeata (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Wheeler *et al.*, 1990; Peng *et al.*, 1992, 1993; Lino-Neto & Dolder 2002, Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005a,b; Mancini *et al.*, 2006) e no Scelionidae *Trissolcus basalis* (Lino-Neto & Dolder, 2001b). Entretanto, em Cynipoidea (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999a) Icheumonoidea (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998; Chauvin *et al.*, 1988) e Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a) tem sido observado uma terceira camada revestindo todo o complexo acrossomal e a extremidade anterior do núcleo. Essa terceira camada localiza-se externamente à membrana celular e caracteriza o acrossomo em tricamada. Ainda em Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a) e Ichneumonoidea (Quicke

et al., 1992), a partir dessa camada irradiam inúmeros filamentos que, provavelmente, correspondem a um glicocálice bastante desenvolvido.

A vesícula acrossomal, com formato oval ou elipsoidal, em corte transversal, também foi observado nas abelhas *Apis mellifera* (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Peng *et al.*, 1992, 1993), Euglossini (Zama *et al.*, 2005a), Bombini (Zama, 2003), Xylocopini (Fiorillo *et al.*, 2005b), em Vespidae (Mancini *et al.*, 2006) e no Sphecidae *Sceliphron fistularium* (Zama *et al.*, 2005b). Entretanto, estas espécies apresentam o *perforatorium* circular, exceto *Apis mellifera* que, como *P. nasuta*, tem o formato acompanhando aquele da vesícula acrossomal. Por outro lado, nas abelhas Meliponini (Zama *et al.*, 2004) e em formigas (Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007) a vesícula acrossomal varia de circular a triangular à medida que se aproxima do núcleo, e o *perforatorium* é circular.

O núcleo dos espermatozóides dos Hymenoptera geralmente apresenta a cromatina bastante elétron densa e homogeneamente compacta. Mas, em algumas espécies a cromatina se apresenta em grossos filamentos não compactados, como em *P. nasuta*, nas abelhas *Melipona marginata* e *M. rufiventres* (Zama *et al.*, 2004) e *Pseudauchlora graminea* spp. (Fiorillo *et al.*, 2005) e nas formigas do gênero *Pseudomyrmex* (Moya *et al.*, 2007). Entretanto, nessas espécies de abelhas a cromatina é inteiramente frouxa, enquanto que em *P. nasuta* e *Pseudomyrmex* só a cromatina da periferia do núcleo apresenta-se frouxa. Ainda, em *P. nasuta* essa descompactação apenas ocorre na região nuclear basal, enquanto que nas demais espécies citadas ela ocorre ao longo de todo o núcleo. Adicionalmente, em algumas espécies, como observado na formiga *Solenopsis invicta* (Lino-Neto & Dolder, 2002) e nas abelhas *Dialictus* spp. (Fiorillo *et al.*, 2005a) a cromatina é compacta, mas com lacunas elétron lúcidas. Na espécie estudada no presente trabalho, o núcleo dos espermatozóides responde ao E-PTA semelhante ao que se observou para as abelhas das tribos Bombini (Zama, 2003), Meliponini (Zama *et al.*, 2004) e Euglossini (Zama *et al.*, 2005a). Nestas espécies, quando observado em corte transversal, a maior área nuclear é negativa, mas com uma região, geralmente central, fortemente E-PTA positiva. Apesar dessa semelhança entre estas espécies, em *P. nasuta* a área E-PTA positiva é circular, enquanto que naquelas abelhas ela é, quase sempre, em forma de bastão que chega, às vezes, de uma extremidade a outra do núcleo, especialmente, nos Euglossini. Nos demais Hymenoptera estudados, o núcleo dos espermatozóides é homogeneamente E-

PTA negativo ou apenas levemente positivo (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Zama *et al.*, 2005d).

O adjunto do centríolo do tipo assimétrico, como ocorre em *P. nasuta*, tem sido observado em muitos outros Hymenoptera como, por exemplo, alguns Symphyta (Newman & Quicke, 1999a), nas vespas parasíticas Braconidae (Newman & Quicke, 1998), Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b) e Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000) e nos Aculeata Sphecidae (Zama *et al.*, 2005d), Vespidae (Mancini, *et al.*, 2006), Apidae (Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a; Bão *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005, Fiorillo *et al.*, 2005b) e Halictidae (Fiorillo *et al.*, 2005a). Nestes insetos, o adjunto do centríolo começa justo abaixo ou sobrepondo levemente a extremidade posterior do núcleo. Já no Symphyta *Tremex* sp. (Siricoidea) (Newman & Quicke, 1999b), em formigas (Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002, Moya *et al.*, 2007) e em Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a) o adjunto do centríolo é dito simétrico, pois ele começa acima da base nuclear e termina sobre a extremidade anterior dos dois derivados mitocondriais. Em Scelionidae não foi observada qualquer estrutura que se assemelhe ao adjunto do centríolo (Lino-Neto & Dolder, 2001b).

Em muitos Hymenoptera o adjunto do centríolo do tipo assimétrico, em corte transversal, é aproximadamente triangular como em Halictidae (Fiorillo *et al.*, 2005) e Vespidae (Mancini *et al.*, 2006), diferente de *P. nasuta*, onde ele é oval e, ainda, com reentrâncias em toda a periferia. Esta estrutura quando tratada com E-PTA apresenta apenas a periferia positiva, como já observada em outras espécies (Lino-Neto *et al.*, 2000b, Zama, 2003, Zama *et al.*, 2004, 2005a,b,c).

Prorops nasuta, apresentando os derivados mitocondriais totalmente simétricos em cortes transversais, difere da grande maioria dos Aculeata, como, por exemplo, abelhas e vespas. Nestas, os derivados mitocondriais são acentuadamente assimétricos em formato e área, além de apresentarem material paracristalino apenas no derivado mitocondrial maior (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Peng *et al.*, 1992, 1993; Lino-Neto *et al.* 2000b; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a,b,c; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005a,b Mancini *et al.*, 2006). Entre os Aculeata até então estudados, apenas as formigas apresentam derivados mitocondriais totalmente simétricos (Wheeler *et al.*, 1990; Wheeler & Krutzsch, 1992; Lino-Neto & Dolder, 2002, Moya *et al.* 2007), incluindo a presença de material paracristalino em ambos os nos dois derivados. Entretanto, o formato e a disposição desse material, nos

derivados de *P. nasuta*, não foram observados em nenhum outro Hymenoptera. Em Symphyta, ocorrem derivados mitocondriais simétricos, em formato e área, ou levemente assimétricos, como em *Tremex* sp. (Siricoidea) e *Cephalcia arvensis* (Pamphiloidea), e acentuadamente assimétricos, em área, como observado em *Xyela julli* (Xyeloidea) (Newman & Quicke, 1999a). Em vespas parasíticas também os derivados mitocondriais podem ser simétricos, como na maioria dos Chalcidoidea (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001a) e Ichneumonoidea (Quicke *et al.*, 1992), ou assimétricas, como observado no Cynipoidea *Leptopilina heterotoma* (Newman & Quicke, 1999b) e no Megalyroidea *Megalyra fasciipennis* (Newman & Quicke, 2000). Ainda em corte transversal, nos espermatozóides de abelhas (Lino-Neto *et al.* 2000b; Zama, 2003; Zama *et al.* 2001, 2004, 2005a; Fiorillo *et al.*, 2005a, b) foram descritas quatro regiões no derivado mitocondrial maior e três no menor. Já *P. nasuta* apresenta apenas duas regiões em cada derivado: a de material paracristalino e a das cristas mitocondriais.

A localização das cristas mitocondriais em *P. nasuta*, na face lateral de cada derivado, é semelhante a *Apis mellifera* (Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Peng *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 2000b) e Sphecidae (Quicke *et al.*, 1992; Zama *et al.*, 2005b, c). Já nas abelhas Bombini (Zama *et al.*, 2003), Meliponini (Zama *et al.*, 2004), Euglossini (Zama *et al.*, 2005a), Halictidae (Fiorillo, *et al.*, 2005a) e Xylocopini (Fiorillo *et al.*, 2005b), em formigas (Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007) e Vespidae (Mancini, *et al.*, 2006) as cristas aparecem restritas à face distal do derivado em relação ao axonema. As cristas mitocondriais em *P. nasuta* são bem desenvolvidas, chegando a alcançar a região de material paracristalino, o que não foi observado ainda em nenhum outro Hymenoptera.

Em *P. nasuta*, a região de cristas é E-PTA negativa, enquanto a região de material paracristalino é positiva. Resultado semelhante foi observado em Meliponini (Zama *et al.*, 2004), Euglossini (Zama *et al.*, 2005a) e Sphecidae (Zama *et al.*, 2005d). Entretanto, em Apini (Lino-Neto *et al.*, 2002b) e Bombini (Zama, 2003) ambas as regiões são E-PTA negativas.

A conformação do axonema de 9+9+2 microtúbulos, observada em *P. nasuta*, é considerada padrão para insetos. Entretanto, variações nesse padrão podem ocorrer, embora raras. Em todos os Hymenoptera já estudados, apenas nas formigas do gênero *Pseudomyrmex* foi observado um axonema com 9+9+1 microtúbulos (Moya, *et*

al., 2007), denominado assim por apresentar apenas um microtúbulo central e não dois como no padrão.

Na seqüência de terminalização dos microtúbulos, na região final do axonema, *P. nasuta* assemelha-se aos demais Aculeata estudados (*q.v.*), no qual os microtúbulos da dupla e o par central terminam primeiro que os microtúbulos acessórios, exceto em Formicidae (Lino-Neto & Dolder, 2002) onde todos os microtúbulos finalizam aproximadamente juntos. Já nos Parasítica, os acessórios terminam primeiro, seguidos dos centrais e finalmente das duplas (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b). Entretanto, excepcionalmente em *P. nasuta*, os microtúbulos acessórios terminam, aparentemente, bem depois os demais. Isso é possível supor porque, nas micrografias, é grande a quantidade de axonemas apresentando apenas estes microtúbulos. Se de fato os microtúbulos acessórios terminarem bem depois dos demais, é possível que a longa região delgada no final do flagelo contenha apenas esses microtúbulos.

Todos os microtúbulos responderam positivamente ao método de E-PTA, diferente do que ocorre em Sphecidae (Zama *et al.*, 2005d), Apini (Lino-Neto *et al.*, 2000b), Meliponi (Zama *et al.*, 2004) e Euglossini (Zama *et al.*, 2005), onde apenas os microtúbulos centrais são E-PTA positivos. Já em Bombini (Zama, 2003), os microtúbulos acessórios e os centrais são positivos, enquanto que os microtúbulos das duplas são negativos.

A análise morfológica dos espermatozoides de *P. nasuta* vem dar suporte a idéia de que essas células apresentam um padrão geral básico para Hymenoptera e, também, de que há diferenças, as quais podem ser sutis ou, até mesmo, bastante significativas. Portanto, podendo fornecer dados que poderão ser utilizados para resolver incertezas sobre as relações filogenéticas deste grupo de insetos. Entretanto, ainda é necessário que espécies representantes de outras famílias de Crysidoidea sejam estudadas, para determinar se as novas características encontradas em *P. nasuta*, como, por exemplo, a redução no diâmetro do flagelo e o formato e a disposição do material paracristalino, estão presentes apenas nesta espécie, em toda a família ou, mesmo, na superfamília.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, Y.J., Moore, D., Godwin, G. (1990). Rearing and aspects of biology of *Cephalonomia stephanoderis* and *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae) parasitoid of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research*. 80: 121-128.
- Araujo, V.A., Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H. (2005). Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptatrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science*. 22:137-141.
- Baccetti, B. (1972). Insects sperm cells. *Advances in Insects Physiology*, 9: 315-397.
- Baccetti, B. (1987). News on phylogenetical and taxonomical spermatology. In: Mohri, H. *New Horizons in Sperm Cell Research*. Tokyo: *Japanese Scientific Societies Press*, p. 333-348.
- Báo S.N., Simões D.G. & Lino-Neto J. (2004). Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia) sp.* Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 36, 23-28.
- Brothers, D. J. & Carpenter. J.M. (1993). Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea. *Journal of Hymenoptera Research*, 2:227-302.
- Chauvin, G., El Agoze, M., Hamon, C. & Huignard, J. (1988). Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 17: 359-366.
- Cock, M.J.W. (ed.) (1985). A Review of Biological Control of Pests in the Commonwealth Caribbean and Bermuda up to 1982. Commonwealth Institute of Biological Control, Technical Communication. 9. 218pp. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough*.

- Cruz-Höfling, M.A., Cruz-Landim, C. & Kitajima, E.W. (1970). The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 69-78.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.A.M., Lino-Neto, J., & Bão, S.N. (2005). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 75-81.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto J. & Bão S.N. (2005b). Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Anthophoridae). *Brazilian Journal Morphological Science*. Supplement: 60:
- Finnamore, A.T. & Gauld, I.D. (1995). Bethylidae. In: Hanson, P.E. & Gauld, I.D. Hymenoptera da Costa Rica. Oxford. *Oxford university Press*, P. 470-479.
- Hoage, T.R. & Kessel, R.G. (1968). An electron microscopical study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee with special reference to replication and elimination. *Journal of Ultrastructure Research*, 24: 6-32.
- Infante, F., Mumford, J., & Garcia, A. (2003). Predation by native arthropods on the African parasitoid *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethylidae) in coffee plantations of Mexico. *Florida Entomol.* 86:86-88
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R. & Afzelius, B.A. (1999). Insects: their spermatozoa and phylogeny. *Scientific Publishers, Enfield, N.H.*
- Lingmei, D. & Dunsu, W. (1987). Ultrastructural observations on the spermatozoa of *Trichogramma*.—*Acta Zoologica Sinica*, 33: 262-266.
- LaSalle, J. & Gauld, I.D. (1992). Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In Hymenoptera and Biodiversity, (Eds. J. LaSalle and I.D. Gauld). *CAB International, UK*, pp. 1-26
- Lino-Neto, J., Bão, S.N. & Dolder, H. (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28: 253-259.
- Lino-Neto, J., Bão, S.N. & Dolder, H. (2000a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica*, 81: 205-211.

- Lino-Neto, J., Bao, S.N. & Dolder, H. (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue & Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2002). Sperm structure and of ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell*, 34: 124
- Lensky, Y., Ben-David, E. & Schindler, H. (1979). Ultrastructure of the spermatozoan of the mature drone honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 18: 264-271.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos., L.A.O. & Dolder, H., (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux*. 53: 333-338.
- Moya, J., Mancini, K., Lino-Neto, J., & Dolder, H., (2007). The exclusive 9+9+1 axoneme of *Pseudomyrmex penetrator* spermatozoa (Hymenoptera: Formicidae) *Brazilian Journal Morphological Science*, Supplement: 22: 55-56.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J. (1998). Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *Journal of Hymenoptera Research*, 7:, 25-37.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J. (1999a). Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 35-47.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J. (1999b). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 197-203.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J. (2000). Sperm and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research*, 9: 62-70.

- Peng, C.Y.S., Yin, C.M. & Yin, L.R.S. (1992). Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiological Entomology*, 17: 269-276
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M. & Yin, L.R.S. (1993). Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiological Entomology*, 18: 93-101.
- Quicke, D.L.J., Ingram, S.N., Baillie, H.S. & Gaitens, P.V. (1992). Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta*, 2:, 381-402.
- Reis, P.R. & Souza, J.C. (1998) Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, 19: 17-25.
- Thompson T.E. & Blum M.S. (1967). Structure and behavior of spermatozoa of fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera – Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 60: 632 – 642.
- Wheeler, D.E., Crichton, E.G. & Krutzsch, P.H. (1990). Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology*, 206: 343-350.
- Zama U. (2003) Estudo Estrutural e Ultraestrutural dos Espermatozóides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com Considerações Filogenéticas. Tese DS . Universidade de Campinas, Brasil.
- Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001). Ultrastructure of Spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research*, 10: 261-270.
- Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2004). Structural and Ultrastructural of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell*, 1: 29-41.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Melo, S.M. & Dolder, H. (2005a). Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux*, 52: 122-131.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., & Bão, S.N. (2005b). The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom

(Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 313-321.

4. Conclusões

Nossos resultados demonstraram que a morfologia dos espermatozoides de *Prorops nasuta* é semelhante ao descrito para os outros Hymenoptera, com algumas diferenças que definem a espécie, à saber:

1. Está entre os maiores espermatozoides de Hymenoptera;
2. Apresenta espermatozoides com longa região delgada terminal;
3. Adjunto do centríolo mostrando periferia pregueada;
4. Derivados mitocondriais simétricos com material paracristalino em ambos, ocupando a face adjacente ao outro derivado;
5. Cristas mitocondriais bem desenvolvidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, Y.J., Moore, D., Godwin, G. (1990). Rearing and aspects of biology of *Cephalonomia stephanoderis* and *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae) parasitoid of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research*. 80: 121-128.
- Araujo, V.A., Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H. (2005). Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptatrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science*. 22:137-141
- Baccetti, B. (1972). Insects sperm cells. *Advances in Insects Physiology*, 9: 315-397.
- Baccetti, B. (1987). News on phylogenetical and taxonomical spermatology. In: Mohri, H. *New Horizons in Sperm Cell Research*. Tokyo: Japanese Scientific Societies Press, p. 333-348.
- Báo S.N., Simões D.G. & Lino-Neto J. (2004). Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia) sp.* Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 36: 23-28.
- Brothers, D.J. & Carpenter. J.M. (1993). Phylogeny of Aculeata : Chrysoidea and Vespoidea. *Journal of Hymenoptera Research*, 2:227-302.
- Carcupino, M., Profili, G., Kathirithamby, J. & Mazzini, M. (1995). Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 166: 291-296.
- Chauvin, G., El Agoze, M., Hamon, C. & Huignard, J. (1988). Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 17: 359-366.
- Cock, M.J.W. (ed.) (1985). A Review of Biological Control of Pests in the Commonwealth Caribbean and Bermuda up to 1982. *Commonwealth Institute of Biological Control, technical Communication*. 9. 219pp. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough*.

- Cruz-Höfling, M.A., Cruz-Landim, C. & Kitajima, E.W. (1970). The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 69-78.
- Dallai, R. & Afzelius, B.A. (1990). Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *Journal of Structural Biology*, 103:164-179.
- Dallai, R. & Afzelius, B.A. (1995). Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 166: 301-310.
- Dallai, R. (1979). An overview of atypical spermatozoa in insects. In W. Fawcett and J. M. Bedford (Eds) *The Spermatozoon*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, pp. 253-256.
- Dowton, M. & Austin, A.D. (1994). Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 9911-9915.
- Dowton, M., Austin, A. D., Dillon, N. & Bartowsky, E. (1997). Molecular phylogeny of the apocritan wasps: the Proctotrupomorpha and Evaniomorpha. *Systematic Entomology*, 22: 245-255.
- Finnamore, A.T. & Gauld, I.D. (1995). Bethyliidae. In: Hanson, P.E. & Gauld, I.D. *Hymenoptera da Costa Rica*. Oxford. *Oxford university Press*. P. 470-479.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.A.M., Lino-Neto, J., & Bão, S.N. (2005a) Structure and Ultrastructure of the Spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 75-81.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto J. & Bão S.N. (2005b). Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Anthophoridae). *Brazilian. Journal Morphological Science*. Supplement: 60:
- Gaston, K.J. (1991). The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology*, 5: 283- 296.
- Gauld, I.D. & Bolton, B. (1988). *The Hymenoptera*. Oxford: *Oxford University Press*.
- Gauld, I.D. & Hanson, P.E. (1995). The evolution, classification and identification of the Hymenoptera. In P. E. Hanson & I.D. Gauld (Eds) *The Hymenoptera of Costa Rica* (pp. 138-156). New York: Oxford University Press.
- Gallo, D. et al. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

- Hanson, P.E. (1995). Economic importance of Hymenoptera. In P.E. Hanson & I.D. Gauld (Eds). *The Hymenoptera of Costa Rica*, p.89-100. New York: Oxford University Press. 1995.
- Hoage, T.R. & Kessel, R.G. (1968). An electron microscopical study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee with special reference to replication and elimination. *Journal of Ultrastructure Research*, 24: 6-32.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R. & Afzelius, B.A. (1999). *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire (USA). pp 555.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Silva, A.C & Assis, M.G.P. (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas - número 12 – Setembro*.
- Kevan, P.G & Baker, H.G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Reviews of Entomology*, 28: 407-453.
- LaSalle, J. & Gauld, I.D. (1992). Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In *Hymenoptera and Biodiversity*, (Eds. J. LaSalle and I.D. Gauld) .CAB International, UK. pp. 1-26.
- Lensky, Y., Ben-David, E. & Schindler, H. (1979). Ultrastructure of the spermatozoan of the mature drone honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 18: 264-271.
- Lino-Neto, J., Bão, S.N. & Dolder, H. (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28: 253-259.
- Lino-Neto, J., Bão, S.N. & Dolder, H. (2000a). Structure and Ultrastructure of the Spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica*, 81: 205-211.
- Lino-Neto, J., Bão, S.N. & Dolder, H. (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue & Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*, 30: 89-96.

- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2002). Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell*, 34: 124
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos., L.A.O. & Dolder, H. (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux*, 53: 333-338.
- Moya, J., Mancini, K., Lino-Neto, J., & Dolder, H. (2007). The exclusive 9+9+1 axoneme of *Pseudomyrmex penetrator* spermatozoa (Hymenoptera: Formicidae) *Brazil Journal Morphological Science*, Supplement: 22: 55-56.
- Murphy, S.T., & Moore, D. (1990). Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News and Information*, 11: 107-117.
- Newman, T.M. and Quicke, D.L.J. (1999). Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 35-47.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J. (2000). Sperm and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research*, 9: 62-70.
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M. & Yin, L.R.S. (1992). Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiological Entomology*, 17: 269-276
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M. & Yin, L.R.S. (1993). Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiological Entomology*, 18: 93-101.
- Quezada, J.R. & Urbina, N.E. (1987). La broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei*, y su control. In: Pinochet, J. (ed.), Plagas y Enfermedades de Caracter Epidémico en Cultivos Frutales de la Región Centroamericana, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Informe Técnico. 110: 48-59.
- Quicke, D.L.J., Ingram, S.N., Baillie, H.S. & Gaitens, P.V. (1992). Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta*, 21, 381-402.
- Rasnitsyn, A.P. (1980). The origin and evolution of the Hymenoptera. *Trudy Paleontologicheskogo Instituta*. Akademiya Nauk SSSR, 174: 1-192.

- Reis, P.R. & Souza, J.C. (1998) Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, 19: 17-25.
- Ronquist, F., Rasnitsyn, A.P, Roy, A., Eriksson, K. & Lindgren, M. (1999). Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. *Zoologica Scripta*, 28: 13-50.
- Tachikawa, T., (1980). Bethylids with both useful and unuseful sides (I). *Nôgyô oyobi Engei* (Agriculture & Horiculture), 55: 1130-1134.
- Tachikawa, T., (1985). On the bethylid wasps I. *Forest Pests*, 34: 135-141.
- Terayama, M. (1995). The phylogeny of the bethylid wasp tribe Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylidae). *Proc. Jpn. Soc. Syst. Zool.*, (54): 65-73.
- Thompson T.E. & Blum M.S. (1967). Structure and behavior of spermatozoa of fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera – Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 60: 632 – 642.
- Wheeler, D.E., Crichton, E.G. & Krutzsch, P.H. (1990). Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology*, 206: 343-350.
- Zama U. (2003) Estudo Estrutural e Ultra-estrutural dos Espermatozoides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com Considerações Filogenéticas. Tese DS. Universidade de Campinas, Brasil.
- Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001). Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research*, 10: 261-270.
- Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2004). Structural and ultrastructural of spermatozoa in meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue & Cell*, 1: 29-41.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Melo, S.M. & Dolder, H. (2005a). Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux*, 52: 122-131.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., & Bão, S.N. (2005b). The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 313-321.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Bottura G., Dolder, H., & Bão, S.N. (2005c). The nucleus-flagelum transition in sperm of trypoxilon (*Trypargilum*) subgenus, with emphasis

on a singular centriolar adjunct (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Brazilian Journal of Morphological Science*, Supplement: 56.